

免疫グロブリンによる骨粗しょう症のメカニズム

東京大学大学院 医学系研究科 免疫学

古賀 貴子

1. はじめに 目的

超高齢化社会を前にして、歯周病による咀嚼機能低下や関節症・骨粗鬆症などによる運動機能障害を防止し、QOLを維持することが急務である。関節リウマチ(RA)は免疫応答の異常な活性化や炎症が引き金となり、骨を壊す細胞である破骨細胞の分化や機能が亢進し、関節部位での骨破壊を引き起こす⁽¹⁾。RA骨破壊の機序が明らかにされた後、免疫応答の異常が骨代謝に深くかかわることが解明されてきた。RAでは、炎症関節部位の骨破壊だけでなく、全身性の骨粗しょう症も見られる⁽²⁾。また、RA以外にも全身性エリテマトーデス(SLE)や炎症性腸疾患といった自己免疫疾患、炎症性肝炎や原発性胆汁性肝硬変においても、全身性の骨粗鬆症を伴うことが報告されている⁽³⁻⁶⁾。さらに、多発性骨髄腫も骨融解局所のみならず骨粗鬆症を併発するが⁽⁷⁾、興味深いことに、前癌状態の意義未確定単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)においても、炎症や免疫活性化が生じる以前から、全身性の骨量低下が観察される⁽⁸⁾。上記の疾患に共通して、血清中に高値の免疫グロブリン(Ig)を示す。これは、過剰な免疫グロブリンが、直接骨組織に作用し、骨粗鬆症をもたらす可能性を示している。そこで、本研究は、免疫グロブリンが骨吸収の原因細胞である破骨細胞の分化や機能を直接的・決定的に制御するという仮定を、生体レベルで証明し、また、責任分子を同定して分子メカニズムの詳細を明らかにする。

Igのうち、血液中に最も多く含まれるIgGはFcγ受容体によって認識される。Fcγ受容体には、細胞内でImmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)と呼ばれる領域を持つアダプター分子であるFcRγと会合し、細胞に活性化シグナルを伝達する活性化型受容体と、自身の細胞内領域にImmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)と呼ばれる領域を持って、活性化型受容体に対して抑制的に働く受容体が存在する⁽⁹⁾。マウスに存在する4つのFcγ受容体のうち、破骨細胞前駆細胞において、活性化が受容体であるFcγRIIIと抑制型受容体であるFcγRIIBが優位に発現することを見出した。また、マウスにはDAP12とFcRγという2つのITAM分子が存在する。DAP12単独の遺伝子欠損マウスは破骨細胞分化が傷害されて骨量が増加する大理石骨病を呈するが、FcRγ単独の遺伝子欠損マウスは正常である。しかし、DAP12とFcRγの両遺伝子欠損マウスでは、大理石骨病が重症化する^(10,11)。このことは、FcRγも破骨細胞形成に重要な役割を果たすことを示唆している。しかし、FcRγを介するFcγ受容体の骨代謝における意義は不明であった。

本研究は、Igとその受容体Fcγ受容体の骨代謝・骨疾患における生理的意義を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(2-1) FcγRIIIとFcγRIIBの遺伝子欠損マウスの骨組織を解析し、これらの骨代謝における役割を明らかにする。

(2-2) IgGおよびIgG免疫複合体を破骨細胞分化実験に供し、これらの破骨細胞分化における役割を明らかにし、また、同様の実験をFcγRIII、FcγRIIB遺伝子欠損細胞および全てのFcγ受容体の昨日的発現(細胞表面発現)が障害されるFcRγ遺伝子欠損細胞、更には、Fcγ受容体遺伝子に対するshRNAを用いて、IgGの作用を媒介するFcγ受容体を同定する。

(2-3) IgGまたはIgG免疫複合体を野生型および各種Fcγ受容体発現を制御した遺伝子欠損マウスに投与し、IgGの炎症を介さない直接的な骨代謝への作用とそれを媒介するFcγ受容体の生理的意義を証明する。

(2-4) 炎症性骨破壊モデルとして関節リウマチモデルマウスを用いて、炎症下でのIgGによる骨破壊の機序を明らかにする。

3. 結果 研究成果

(3-1-1) FcγRIII遺伝子欠損マウスの解析に基づく、FcγRIIIの破骨細胞分化における役割
FcγRIIIは破骨細胞前駆細胞に優位に発現する活性化型Fcγ受容体であることから、これを欠損したマウスは破骨細胞分化が抑制されて骨量増加を呈することが予想されたが、結果は逆に、骨粗しょう症を呈した。骨構造解析や骨組織解析、破骨細胞前駆細胞を用いた*in vitro*の破骨細胞分化実験の結果から、FcγRIII欠損マウスは骨芽細胞による骨形成には異常はなく、また骨芽細胞による破骨細胞分化支

持能も正常であるが、破骨細胞自身の分化能が亢進した結果、骨量増加を呈することが明らかとなった。FcγRIII 欠損細胞では、ITAM 下流の PLCγ のリン酸化が亢進し、その結果細胞内カルシウムシグナルが活性化して、破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1(Ref, 12)が自己増幅し、分化が促進していた。このことから、FcγRIII は ITAM シグナルの活性化受容体であるにもかかわらず、破骨細胞においては、ITAM シグナルを抑制することがわかった。そのメカニズムは、破骨細胞前駆細胞で大量に発現する FcγRIII は FcRγ を占有するため、破骨細胞分化を正に制御することのわかっている他の FcRγ 会合性の免疫グロブリン様受容体、OSCAR と PIR-A⁽¹⁰⁾の細胞表面発現が障害され、分化が抑制される、というものであった。破骨細胞分化因子 RANKL の刺激によって分化が進むと、FcγRIII の発現は減少し、OSCAR と PIR-A は FcRγ と会合することが可能となり、分化が促進される。

(3-1-2) FcγRIIB 遺伝子欠損マウスの解析に基づく、FcγRIII の破骨細胞分化における役割

FcγRIIB 欠損マウスも破骨細胞分化の亢進による骨粗しょう症を呈した。FcγRIIB 欠損マウスは B 細胞において Fcγ 受容体を介した ITAM シグナルが恒常的に活性化し、自己抗体産生の亢進により自己免疫疾患を自然発症することが報告されている⁽¹³⁾。我々の動物飼育環境下においても、確かに FcγRIIB 欠損マウスは加齢に伴って、血清中の IgG 値が上昇し、その後、自己免疫疾患の症状を呈した。血清 IgG 値が上昇するが炎症などの自己免疫疾患の症状が認められない 12 週齢の FcγRIIB 欠損マウスで骨粗しょう症が見られたが、IgG レベルが正常な 6 週齢マウスでは見られなかったことから、FcγRIIB 欠損マウスの骨粗しょう症が IgG 高値に関連する可能性が示唆された。そこで、FcγRIIB 欠損マウスの血清中の IgG をサイズクロマトグラフィーにて解析すると、IgG モノマーの高産生と、それよりもサイズの大きい、IgG 免疫複合体を多量に含むことを見出した。この IgG モノマーと IgG 免疫複合体の画分を破骨細胞分化に供すると、IgG モノマーではなく IgG 免疫複合体を添加した細胞に顕著な分化亢進が見られ、分画から Protein G カラムを用いて IgG を除去すると、この効果はなくなった。これらのことから、IgG 免疫複合体が FcγRIIB 欠損マウスにおいて骨粗しょう症を引き起こしていると考えられた。

(3-2) 破骨細胞分化を促進する IgG とその受容体の同定

マウスには IgG のサブクラスとして IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 が存在する。これらはそれぞれのアフィニティーで Fcγ 受容体に結合する⁽¹⁴⁾。FcγRI だけがモノマーの IgG と結合できるが、他の Fcγ 受容体は IgG 免疫複合体を認識する。IgG 免疫複合体はいくつかの Fcγ 受容体を架橋する。この際、抑制型 FcγRIIB と活性化型 Fcγ 受容体を架橋した場合、細胞内シグナルが正と負のどちらに決まるかは、抑制型 FcγRIIB と活性化が Fcγ 受容体の IgG に対するアフィニティーに依存する。マウス IgG1 は FcγRIIB と FcγRIII へのみ認識され、IgG1 に対するアフィニティーは FcγRIIB > FcγRIII (70 倍) のため⁽¹⁴⁾、通常、細胞内シグナルは抑制される。破骨細胞分化においても、これらの IgG と受容体が作用するかについて、IgG サブクラスを含む免疫複合体を作製し、in vitro 破骨細胞分化アッセイより検討した。その結果、IgG1 免疫複合体は FcγRIIB 欠損細胞においてのみ破骨細胞分化が亢進し、FcγRIII に対する shRNA でその効果が消失したことから、IgG1 免疫複合体は FcγRIIB と FcγRIII の発現レベルのバランスが活性化型

(FcγRIII) に傾いている条件において破骨細胞分化を亢進することがわかった。また IgG2a, IgG2b はアフィニティーの違いはあるが、すべての Fcγ 受容体に認識される。このことに矛盾せず、IgG2a や IgG2b を含む免疫複合体は野生型細胞の破骨細胞分化も促進し、この効果は FcγRI または FcγRIV による shRNA 処理によって消失した。FcγRI や FcγRIV は FcγRIIB に対して IgG2a, IgG2b に対するアフィニティーが高いため、IgG が大量に存在する条件下では破骨細胞分化促進に機能することがわかった。

(3-3) IgG 免疫複合体による破骨細胞への直接的促進作用の個体レベルでの証明

これらの免疫複合体をマウス頭蓋冠に投与したところ、破骨細胞分化亢進による骨破壊が認められ、in vitro と一致した結果が得られた。この際、炎症性細胞の浸潤等は見られず、IgG 免疫複合体が直接破骨細胞に作用して骨破壊を起こすことがわかった。

(3-4) 炎症性骨破壊 (関節リウマチ) モデルにおける IgG/Fcγ 受容体システムによる骨破壊機序
以上の結果から、血清中に最も多い IgG1 の免疫複合体からの FcγRIII を介した破骨細胞分化の活性化には、FcγRIIB による抑制が解除される必要があり、野生型のマウスでは IgG1 による骨破壊は怒らないことがわかった。それでは、関節リウマチなどの自己免疫疾患における骨破壊においては、IgG 誘導性の破骨細胞分化は寄与しているのか？関節リウマチモデルとしてコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) モデルマウスを作成した。CIA モデルマウスの血清には高値の IgG1, IgG2a, および IgG2b が含まれていることを確認した。CIA モデルマウスの血清で破骨細胞分化を誘導すると、正常マウスの血清よりも顕著に分化が促進され、血清中の IgG を除去するとこの効果は消失した。また、興味深いことに、CIA モデルマウスから得られた骨髄細胞を用いると、CIA モデルマウスの血清は正常マウスの骨髄細胞と比べてさらに分化が促進した。そこで、CIA モデルマウス由来の骨髄細胞を解析した結果、FcγRIIB の RNA 発現量が減少し、一方、FcγRIII と FcγRIV の発現量が増加していた。IgG1 免疫複合体による CIA モデルマウス由来骨髄細胞からの破骨細胞分化促進効果は、FcγRIII に対する shRNA 処理で消失し、同様に IgG2a 免疫複合体による促進効果は FcγRIV に対する shRNA 処理で消失した。以上のことから、CIA モデルマウスでは、IgG 免疫複合体が存在し、破骨細胞前駆細胞の Fcγ 受容体の発現パターンが変化して活性化型シグナルを伝達しやすくなっていることが、骨破壊の機序のひとつとなることを示し

た。

4. 考察 まとめ

マウス破骨細胞前駆細胞には4つのFc γ 受容体のうち活性化型Fc γ RIIIと抑制型Fc γ RIIBが優位に発現している。生理的条件下では、破骨細胞における活性化型受容体Fc γ RIIIを介したITAMシグナルは抑制型Fc γ RIIBによって打ち消されている。破骨細胞前駆細胞段階では、過剰に発現するFc γ RIIIがFcR γ を独占するため、他の免疫グロブリン様受容体OSCARとPIR-Aの細胞表面発現が抑制され、破骨細胞分化は抑制されている。破骨細胞分化が始まると、Fc γ RIIIの発現は減少し、これと解離したFcR γ がOSCARやPIR-Aと会合可能になり、分化が進む。

炎症などの病的状況下では、正常時に最も多いIgG1だけでなくIgG2等も増加し、これらが形成する免疫複合体が活性化型Fc γ 受容体を介して破骨細胞分化を促進する。Fc γ RIIIを介したIgG1によるシグナルは抑制型Fc γ RIIBによって抑制されるが、病的状況下ではFc γ RIIB発現が低下、一方Fc γ RIII発現が増加するため、細胞内に活性化シグナルが伝達される。また、IgG2は活性化シグナルを伝達するが、Fc γ RIV発現も増加することで更に破骨細胞分化が亢進する。

2013年、Seelingらにより、関節リウマチの骨破壊には破骨細胞上のFc γ RIVが必要である事が報告され⁽¹⁵⁾、我々の知見もこれと一致している。Fc γ RIVの破骨細胞特異的欠損マウスに関節リウマチを起こしても、野生型マウスの関節リウマチ骨破壊に比べ軽度である事が示された⁽¹⁵⁾。Fc γ RIVの破骨細胞特異的欠損マウスは生理的条件下では骨代謝に差異は見られず、炎症部位と全身部位での破骨細胞前駆細胞のFc γ 受容体の発現や重要性に違いがある可能性が示唆される。

これまで、免疫と骨代謝を結ぶ多くのシグナル伝達や細胞間相互作用が研究され、免疫システムによる骨代謝の制御が明らかにされてきた。しかし、免疫系による骨破壊の代表とも言える関節リウマチにおいて、IgGやFc γ 受容体は、炎症の発症の段階にあまりにも大きく寄与し、骨破壊への直接的な関与については検討されてこなかった。関節リウマチの骨破壊は、あくまでも、炎症によって引き起こされる骨破壊、としての認識にとどまってきた。本研究では、骨代謝そのものに直接的に働くIgG/Fc γ 受容体システムの意義を明らかにしたことによって、免疫系以外の生体システムにおけるIgG/Fc γ 受容体の意義を初めて提唱することが出来た。これにより、炎症や免疫異常の状況下での骨破壊だけでなく、広義の骨代謝制御においてIgG/Fc γ 受容体に着目した制御が可能になると考えられる。また、IgG/Fc γ 受容体が直接的に骨代謝を制御する事を明らかにしたことによって、炎症や免疫異常を介さない、IgG高値を示す疾患に全身性骨量低下が併発する危険性を提唱する事に繋がった。

発表論文、参考文献

- (1) Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7**, 292-304 (2007).
- (2) Redlich, K. And Smolen, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 234-250 (2012)
- (3) Teichmann, J., Lange, U., Stracke, H., Federlin, K. & Bretzel, R.G. Bone metabolism and bone mineral density of systemic lupus erythematosus at the time of diagnosis. *Rheumatol Int* **18**, 137-140 (1999).
- (4) Agrawal, M., *et al.* Bone, inflammation, and inflammatory bowel disease. *Current osteoporosis reports* **9**, 251-257 (2011).
- (5) Mounach, A., *et al.* Primary biliary cirrhosis and osteoporosis: a case-control study. *J Bone Miner Metab* **26**, 379-384 (2008).
- (6) Wariaghli, G., *et al.* Osteoporosis in chronic liver disease: a case-control study. *Rheumatol Int* **30**, 893-899 (2010).
- (7) Roodman, G.D. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia* **23**, 435-441 (2009).
- (8) Bouvard, B., *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and osteoporosis. *Joint Bone Spine* **77**, 120-124 (2010).
- (9) Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* **8**, 34-47 (2008).
- (10) Koga, T., *et al.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* **428**, 758-763 (2004).
- (11) Mocsai, A., *et al.* The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (FcR γ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6158-6163 (2004).

- (12) Takayanagi, H., *et al.* Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* **3**, 889-901 (2002).
- (13) Bolland, S. & Ravetch, J.V. Spontaneous autoimmune disease in Fc γ RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* **13**, 277-285 (2000).
- (14) Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **310**, 1510-1512 (2005).
- (15) Seeling, M., *et al.* Inflammatory monocytes and Fc γ receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10729-10734 (2013).

当研究結果は現在 Nature Medicine に投稿中である。